

助成番号 0830

## 腎尿細管上皮細胞におけるマグネシウムチャネルの発現調節機構と 生理学的役割の解明

五十里 彰

静岡県立大学薬学部

**概要** 生体内のマグネシウム含量は、腎尿細管における再吸収機構によって厳密に調節される。マグネシウム不足は、心疾患、脳梗塞、糖尿病などのメタボリックシンドロームの発症や腎障害に関与すると示唆されている。そのため、マグネシウム再吸収に関与するイオン輸送体を同定し、その発現や機能の調節機構を解明することは、生理学および病態生理学的に大変重要である。また、マグネシウム輸送体をターゲットにした新薬の開発は、メタボリックシンドロームの予防や治療につながると期待される。

近年、家族性低マグネシウム血症の患者において、新規マグネシウムチャネル TRPM6 遺伝子に変異が見つかり、マグネシウムホメオスタシスの調節に TRPM6 が深く関与することが示唆されている。TRPM6 は腎臓の遠位尿細管上皮細胞に局在し、生体内と細胞内のマグネシウム濃度の調節に関与すると考えられている。本研究では、未だ解明されていない TRPM6 の発現調節機構を調べ、TRPM6 の生理的役割について検討した。

ラット尿細管由来の NRK-52E 細胞において、内在性の TRPM6 の発現が確認された。上皮成長因子の EGF は、TRPM6 mRNA および蛋白質の発現量を増加させた。内在性および EGF 誘導性の TRPM6 発現は、MEK 阻害剤の U0126 または PI3-K 阻害剤の LY294002 処理によって阻害されたが、JNK 阻害剤の SP600125 や p38 MAP キナーゼ阻害剤の SB202190 では阻害されなかった。ヒト TRPM6 プロモーターアッセイにおいて、-1,214/-718 領域に転写活性がみられた。AP-1 結合領域に変異を導入したところ、コントロールおよび EGF による転写活性が阻害された。また、c-Fos または c-Jun siRNA の導入により、転写活性が阻害された。クロマチン免疫沈降により、TRPM6 プロモーターと AP-1 との結合が確認された。以上のことから、EGF は c-Fos および c-Jun を活性化し、TRPM6 の転写活性を亢進することが明らかになった。

TRPM6 siRNA の導入により、TRPM6 の発現をノックダウンしたところ、細胞増殖が阻害された。フローサイトメーターを用いて細胞周期を解析したところ、TRPM6 ノックダウン細胞では、G1 期の細胞数が多くなり、S 期の細胞数が少なくなった。さらに、G1 期から S 期への移行調節に関与するサイクリン D1 の発現量が低下した。以上のことから、TRPM6 は細胞周期の調節に関与することが示唆された。

尿細管が障害を受けると、EGF などの増殖因子が分泌される。本研究から、EGF による TRPM6 の発現増加は細胞増殖を亢進させ、尿細管障害の修復につながると示唆された。

### 1. 研究目的

生体内のマグネシウム含量は、腎尿細管における再吸収機構によって厳密に調節される。マグネシウム不足は、心疾患、脳梗塞、糖尿病などのメタボリックシンドロームの発症や腎障害に関与すると示唆されている。そのため、マ

グネシウム再吸収に関与するイオン輸送体を同定し、その発現や機能の調節機構を解明することは、生理学および病態生理学的に大変重要である。また、マグネシウム輸送体をターゲットにした新薬の開発は、メタボリックシンドロームの予防や治療につながると期待される。

食物や飲料水中のマグネシウムは小腸で吸収され、イオン型のマグネシウムは腎糸球体でろ過される。その大部分はヘンレ上行脚の傍細胞経路を介して再吸収される (Fig. 1)。一昨年の本財団からの研究助成により、ヘンレ上行脚のタイトジャンクションに発現する新規蛋白質のパラセリン-1 がマグネシウム輸送体として働くことを報告した。さらにパラセリン-1 の分布調節機構を調べ、PKA によるセリンリン酸化が関与することを発見した [1]。

近年、家族性低マグネシウム血症の患者において、新規マグネシウムチャネル TRPM6 遺伝子に変異が見つかり、マグネシウムホメオスタシスの調節に TRPM6 も深く関与することが示唆されている。TRPM6 は腎臓の遠位尿細管上皮細胞に局在し、生体内と細胞内のマグネシウム濃度の調節に関与すると考えられている [2]。TRPM6 に相同性の高いホモログとして、TRPM7 が同定された。TRPM7 は筋細胞や神経細胞を含めて全身にユビキタスに発現しており、細胞内のマグネシウムホメオスタシスの調節に関与すると示唆されている。また、TRPM7 の発現増加による二価カチオンの流入により、細胞周期の進行が亢進することや、TRPM7 発現の抑制や TRPM7 の過剰発現によって細胞死が引き起こされることが報告されている。本研究では、未だ解明されていない TRPM6 の発現調節機構

を調べ、TRPM6 の生理的役割について検討した。

## 2. 研究方法

### 2.1 NRK-52E 細胞の培養

NRK-52E 細胞を DMEM 培地 (5% FCS 含) で培養し、3 ~ 4 日毎にトリプシン溶液を用いて継代した。実験に使用する前日に、FCS フリーの DMEM 培地に置換した。また、細胞周期の解析実験では、0.5% FCS を含んだ DMEM 培地で 48 時間同調培養し、実験に使用する前日に、5% FCS 含 DMEM 培地に置換した。

### 2.2 細胞抽出画分と膜画分の調製

細胞を PBS で 2 回洗浄後、セルスクレーパーで掻き集めマイクロチューブに移し、5,000 rpm、4°C で 2 分間遠心した。上清を除去し、lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% SDS) で懸濁し、20 秒間のソニケーションにより細胞膜を破壊した。これを細胞抽出画分とし、引き続き 8,000 rpm で 5 分間遠心して得られた上清画分を膜画分として使用した。

### 2.3 SDS-PAGE とウエスタンブロット

7.5%、10% または 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。ゲルから PVDF 膜へ蛋白質を転写後、

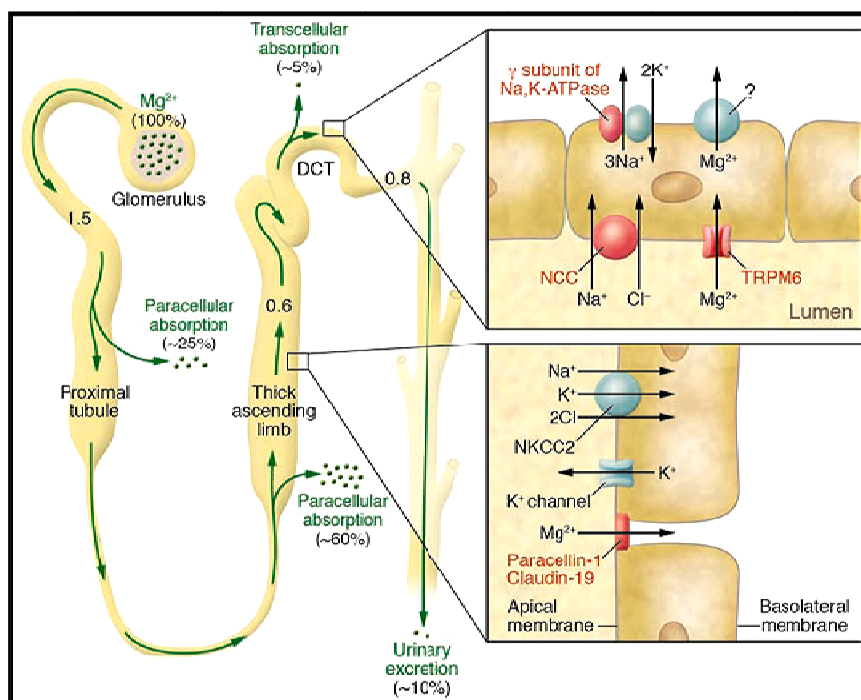


Fig. 1. Schematic model of magnesium transport pathways in renal tubule

一次抗体および二次抗体を反応させた。ブロッキングには5% スキムミルクを使用した。ただし、リン酸化抗体を使用する場合は、2% ウシ血清アルブミンでブロッキングした。バンドの検出には、ECL ウェスタンブロットリング検出試薬およびオートラジオグラフィ用フィルムを使用した。

#### 2.4 細胞内マグネシウム濃度 ( $[Mg^{2+}]_i$ ) の測定

乾熱滅菌をかけた無蛍光性のカバーガラス上に、NRK-52E 細胞を培養した。実験の前日に、血清フリーの DMEM 培地に置換した。  $[Mg^{2+}]_i$  の測定には HBSS (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 4.2 mM  $NaHCO_3$ , 3 mM  $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ , 0.4 mM  $KH_2PO_4$ , 5 mM HEPES, 0.8 mM  $CaCl_2$ , 10 mM Glucose, pH 7.4) を使用した。Mag-fura-2/AM を負荷後、二波長蛍光光度計 (日立 F-2000) を用いて  $[Mg^{2+}]_i$  を経時的に測定した。

#### 2.5 RT-PCR

細胞を PBS で 2 回洗浄後、ISOGEN で溶解し、マイクロチューブに移した。遠心操作により、total RNA を抽出して水に溶解した。得られた RNA の濃度を測定後、逆転写反応を行った。その後、Table 1 のプライマーを使用して、PCR 反応を行った。得られた PCR 産物をアガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイド染色でバンドを確認した。

#### 2.6 siRNA のトランスフェクション

前日に細胞を播種後、Lipofectamine 2000 を用いて TRPM6 siRNA、c-Fos siRNA または c-Jun siRNA をトランスフェクションした。6 時間後に 5% FCS 含 DMEM 培地に置換し、さらに 36~48 時間培養した。

#### 2.7 プロモーターアッセイ

ヒト TRPM6 5'-flanking 領域の -1,214/-718 を PCR で増幅後、pGL4.1 ルシフェラーゼベクターにサブクローニングした。PCR 法により、デリーションベクターを作製した。また、Mutagenesis kit を用いて、AP-1 結合領域の変異体を作製した。pGL4 ベクターと pRL-TK ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、6 時間後に 5% FCS 含 MEM 培地に置換し、さらに 48 時間培養した。Dual-Glo Luciferase assay kit を用いて、ルシフェラーゼの発光強度を測定し、TRPM6 のプロモーター活性を算出した。

#### 2.8 クロマチン免疫沈降

HEK293 細胞をコンフルエントまで培養し、薬物処理後、EZ Chip Chromatin Immunoprecipitation kit を用いて、免疫沈降を行った。免疫沈降には、c-Fos または c-Jun 抗体を使用した。得られた沈降物を鋳型とし、Table 2 のプライマーを用いて PCR を行った。

Table 1. プライマーの配列

Primer			Sequence
TRPM6	Sense	TRPM6-314S	5'-CTTCTTGGGATACAAAATCGG-3'
	Anti-sense	TRPM6-1575AS	5'-GAAACTTTTCTAGTGTAGCTG-3'
TRPM7	Sense	TRPM7-821S	5'-GAATTCATGCTAGAATTGGGCAAGG-3'
	Anti-sense	TRPM7-1831AS	5'-GCGCTTGGTCTCTGGATCATC-3'
c-Fos	Sense	c-Fos-390S	5'-GCAGCTATCTCCTGAAGAGGAA-3'
	Anti-sense	c-Fos-904AS	5'-CTGCTGCATAGAAGGAACCAG-3'
c-Jun	Sense	c-Jun-374S	5'-ATACGCTGCCAGTGTCACCT-3'
	Anti-sense	c-Jun-892AS	5'-CCAGCTCGGAGTTTTGCGCTTTC-3'
$\beta$ -actin	Sense	RAc1	5'-TCCTAGCACCATGAAGATC-3'
	Anti-sense	RAc2	5'-AAACGCAGCTCAGTAACAG-3'

Table 2.

Primer			Sequence
AP-1	Sense	AP-P421S	5'-CTGTGTGCTTTGTGCCACCTC-3'
	Anti-sense	AP-P616AS	5'-GAAATGGGGTCTCACTATGTTG-3'

## 2. 9 細胞増殖および細胞死の測定

NRK-52E 細胞を 96 wells プレートに培養し、薬物処理や siRNA のトランスフェクションを行った。Cell counting kit(同仁化学)を用いて、細胞増殖を測定した。また、アポトーシスとネクロトーシスの評価のため、細胞に annexin V-FITC と propidium iodide を負荷した。蛍光顕微鏡で、annexin V の緑色蛍光と propidium iodide の赤色蛍光を観察した。

## 2. 10 細胞周期の測定

NRK-52E 細胞を 6 wells プレートに播種し、0.5% FCS 含 DMEM で 18 時間同調培養した。薬物処理または siRNA のトランスフェクション後、24 時間培養した。その後、5% FCS 含 DMEM に置換し、24 時間培養した。細胞を剥離し、propidium iodide を負荷した。BD FACS Canto 2 Flow Cytometer を用いて細胞周期を測定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 細胞接着刺激および EGF による TRPM6 の増加

ラット腎尿細管由来 NRK-52E 細胞を用いて、TRPM6 の発現調節機構をウエスタンブロットにより確認した。EGF を添加後、濃度依存的な ERK のリン酸化が観察された

(Fig. 2)。このリン酸化は、MEK 阻害剤の U0126 により阻害された。ERK のリン酸化に比例して、TRPM6 の発現量が変化した。TRPM6 発現に対する細胞接着刺激の影響を調べるため、コーティング処理のない培養プレートを使用した。コーティング済みのプレートには、細胞を播種してから 6 時間後、24 時間後に、87.9% と 84.5% の接着率であった。細胞接着阻害剤の cRGDFV 存在下では、52.9% と 66.4% であった。コーティング処理のないプレートでは、23.0% と 51.8% であった。細胞接着率が低い状態では、ERK のリン酸化量が低く、TRPM6 の発現量も低かった。以上のことから、ERK のリン酸化が TRPM6 の発現調節に関与すると示唆された。p38 MAP キナーゼ阻害剤の SB202190、JNK 阻害剤の SP600125 は、TRPM6 発現に影響を及ぼさなかったことから(結果は示さない)、これらのシグナル伝達系は TRPM6 の発現調節に関与しないと示唆された。

### 3. 2 EGF によるマグネシウム流入の増加

TRPM6 の発現量に比例して細胞内へのマグネシウム流入が変化するのかを調べるために、 $[Mg^{2+}]_i$  の変化量を測定した。細胞外に 1 mM  $MgCl_2$  を添加すると、時間依存的に  $[Mg^{2+}]_i$  が上昇した (Fig. 3)。 $[Mg^{2+}]_i$  の変化量は、

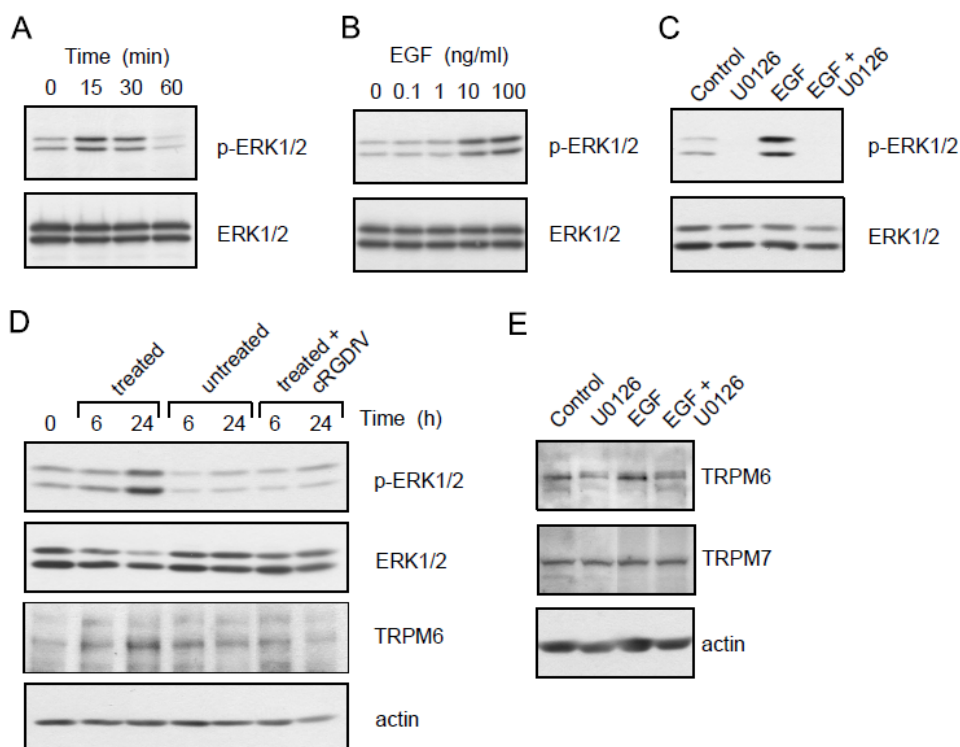


Fig. 2. Increase in TRPM6 expression by the phosphorylation of ERK1/2

EGF により増加し、U0126 により減少した。この結果は、TRPM6 発現量の結果と一致する。以上のことより、ERK 経路による TRPM6 の発現変化は、細胞内へのマグネシ

ウム流入に影響を及ぼすと示唆された。

### 3. 3 EGF による TRPM6 転写活性の亢進

ヒト TRPM6 5'-flanking 領域を組み込んだ pGL4 ベクターを用いて、転写活性を測定した。-1,214/-718 を含むベクターでプロモーター活性が確認された (Fig. 4)。EGF はプロモーター活性を増大したことから、TRPM6 の発現増加には転写活性の亢進が関与すると示唆された。100 bp ずつのデリベーションアッセイにより、-842/-718 領域に転写活性化部位があることが明らかになった。また、この領域に含まれる AP-1 結合領域に変異を導入したところ、コントロールおよび EGF による転写活性が阻害された。以上のことより、c-Fos または c-Jun が TRPM6 のプロモーター領域に作用し、転写活性が亢進すると示唆された。

### 3. 4 c-Fos および c-Jun の TRPM6 転写調節領域への結合

TRPM6 の転写調節において、c-Fos および c-Jun の関与を明確にするため、クロマチン免疫沈降を行った。c-Fos または c-Jun 抗体で免疫沈降を行い、TRPM6 プロモーター領域の PCR を行ったところ、コントロールと EGF 処理細胞でバンドが確認されたが、U0126 処理細胞ではバンドが検出されなかった。また、ネガティブコントロールとして、ヤギ IgG で免疫沈降したサンプルでは、バンドが検出されなかった。プロモーターアッセイにおいて、c-Fos または c-Jun siRNA を導入したところ、コントロールと

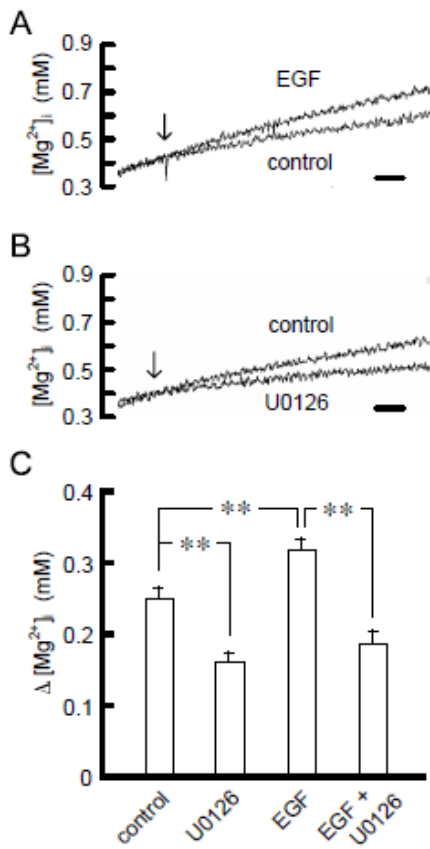


Fig. 3. Inhibition of magnesium influx by U0126

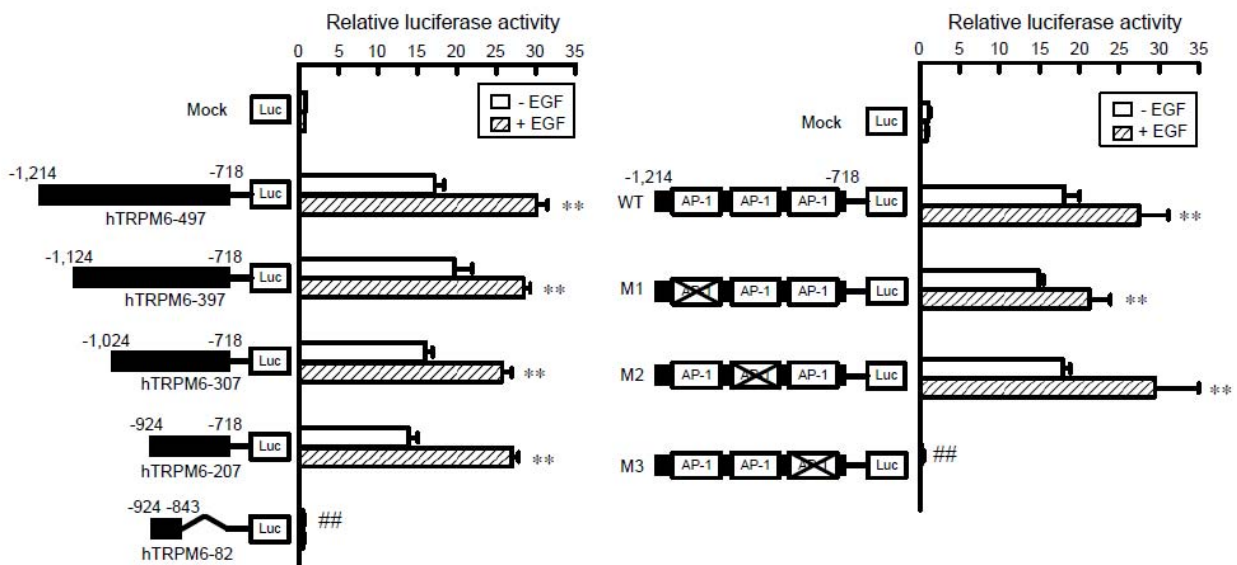


Fig. 4. Increase in promoter activity by EGF

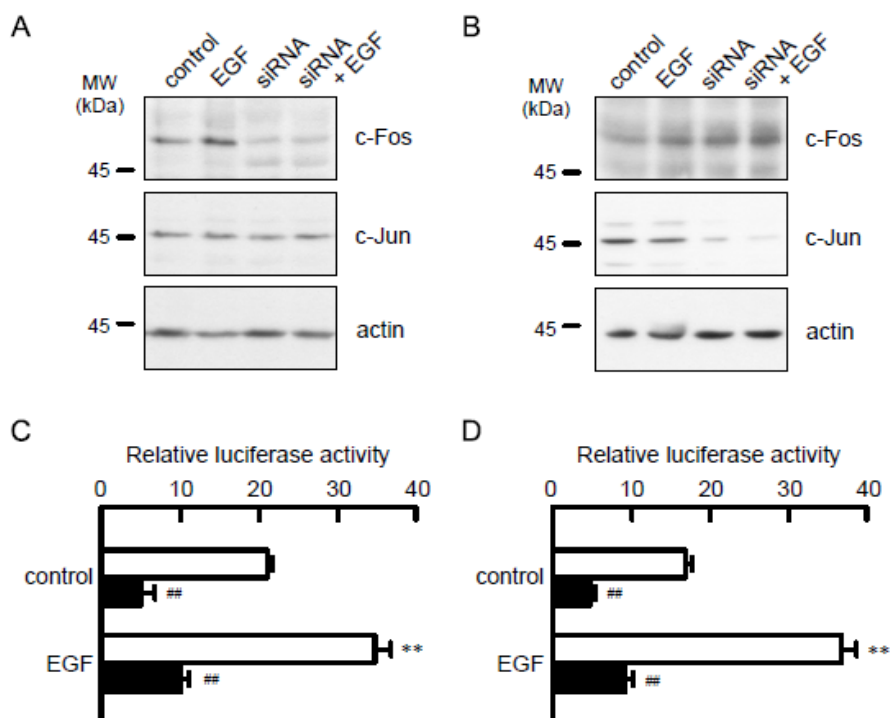


Fig. 5. Decrease in promoter activity by c-Fos and c-Jun siRNA

EGF による転写活性が抑制された (Fig. 5)。以上のことより、TRPM6 プロモーター領域に、c-Fos および c-Jun が結合し、転写活性を亢進することが明らかになった。

### 3. 3 EGF による細胞増殖の増加

EGF は細胞増殖を促進し、U0126 は抑制した (Fig. 6)。また、TRPM6 siRNA の導入により、U0126 と同様に細胞増殖が低下した。本測定では、細胞増殖の低下が、細胞傷害および細胞死の増大によることが考えられる。そこで、細胞傷害に対する TRPM6 の発現阻害剤の影響を検討した。TRPM6 の発現阻害剤では、ほとんど LDH が漏出しておらず、細胞傷害が起きていないことが示された (結果は示さない)。次に細胞死の関与について検討した。TRPM6 の発現阻害剤により細胞死が誘導されるのかを、annexin V と propidium iodide の二重染色を利用して検討した。アポトーシスのポジティブコントロールとして 50  $\mu$ M シスプラチンを処理した場合、細胞膜に沿った annexin V の染色と propidium iodide の核染色が観察された。また、ネクロトーシスのポジティブコントロールとしてエタノール処理した場合、propidium iodide の核染色のみが観察された。一方、TRPM6 の発現阻害剤で処理した場合、annexin V と propidium iodide の両方で染色されなかったことから、細

胞死が誘導されないことが明らかになった。以上のことから、TRPM6 を介したマグネシウム流入が細胞死に影響するのではなく、細胞周期の調節に関与すると示唆された。

### 3. 4 細胞周期調節因子に対する TRPM6 発現の影響

サイクリン依存性キナーゼ (CDKs) はサイクリンと複合体を形成することにより、細胞周期の進行を促進させる。一方、p27<sup>Kip1</sup>、p21<sup>Cip1</sup>、p16<sup>Ink4a</sup> などの CDK 阻害因子は、サイクリン-CDK 複合体に結合し、細胞周期の進行を阻害する。これまでにサイクリン D1-CDK4 複合体の活性化に、MEK/ERK 経路が関与することが報告されている。そこで、サイクリン D1 と p27<sup>Kip1</sup> の蛋白質発現量をウエスタンブロットで検討したところ、EGF によりサイクリン D1 が増加し、U0126 は EGF の効果を阻害した (Fig. 7)。一方、p27<sup>Kip1</sup> の発現量はほとんど変化しなかった。また、TRPM6 siRNA によってサイクリン D1 が減少し、p27<sup>Kip1</sup> は変化しなかった。これらの結果は、U0126 の結果と類似する。このことから、NRK-52E 細胞において、細胞周期の進行に MEK/ERK 経路を介した TRPM6 発現の上昇が関与し、サイクリン D1 の増加により細胞周期が促進されると示唆された。

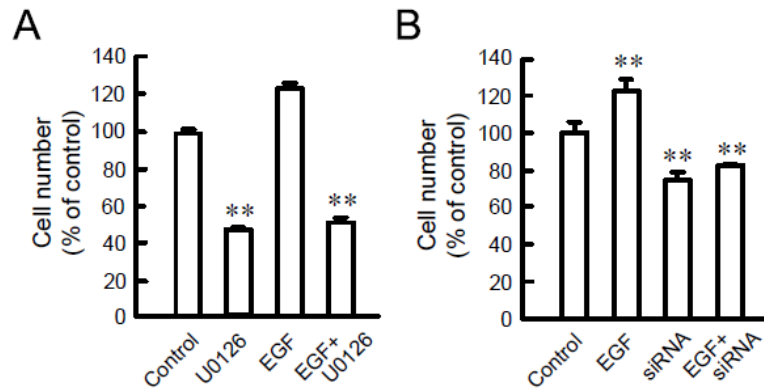


Fig. 6. Decrease in cell proliferation by U0126 and TRPM6 siRNA

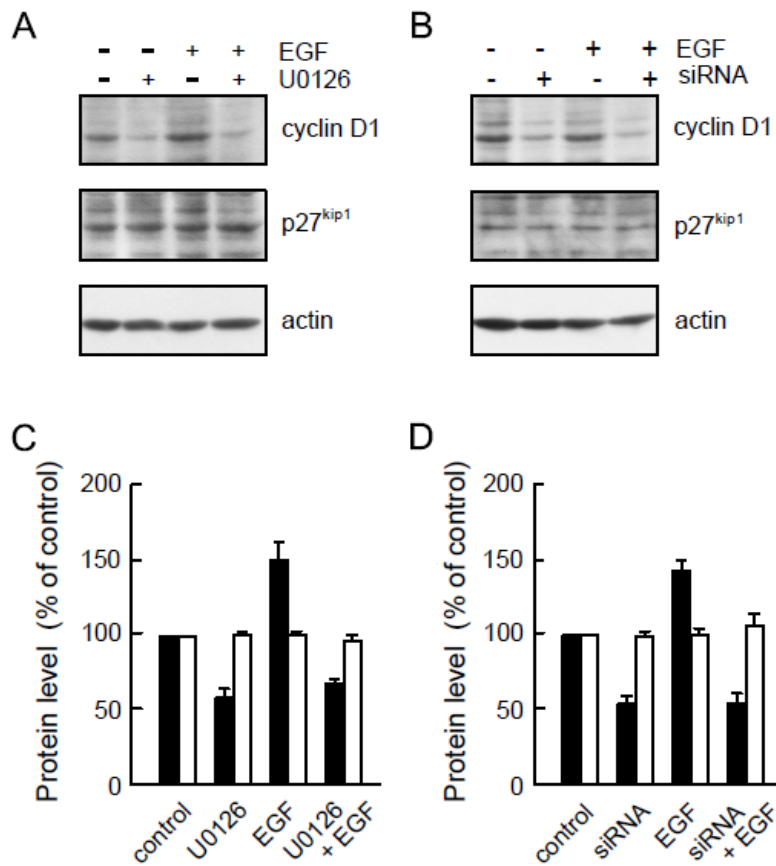


Fig. 7. Decrease of cyclin D1 expression by U0126 and TRPM6 siRNA

### 3.5 細胞周期の調節に対する TRPM6 発現の影響

細胞周期調節因子が MEK/ERK 経路によって調節されることが示されたので、フローサイトメーターを用いて細胞周期を観察した。EGF により G1 期の細胞が減少し、S 期の細胞が増加した。これはサイクリン D1 蛋白質発現の

増加に付随した現象と考えられる。一方、U0126 により G1 期の細胞が増加し、S 期の細胞が減少した。さらに TRPM6 siRNA によって G1 期の増加と S 期の減少が見られた。以上の結果から、TRPM6 の発現抑制によりサイクリン D1 蛋白質発現が減少し、細胞周期の G1 期から S 期へ

の移行が抑制されることが示唆された。

#### 4. 考察

マグネシウムは生体内で300種類以上の酵素の補助因子として働き、DNA合成、蛋白質合成、細胞増殖などの調節において重要な役割を担う。それにも関わらず、生体内および細胞内マグネシウムホメオスタシスの調節機構は不明な点が多い。これまでに、マグネシウム輸送体としてNa<sup>+</sup>依存性 Mg<sup>2+</sup>交換体、Na<sup>+</sup>非依存性 Mg<sup>2+</sup>交換体、マグネシウムチャネルなどの存在が示されてきた。当研究室では、NRK-52E細胞において、Na<sup>+</sup>依存性 Mg<sup>2+</sup>流出がNO/cGMPによって、Na<sup>+</sup>非依存性 Mg<sup>2+</sup>流出が20-HETEによって活性化されることを報告している。しかし、これら流出経路に関わる分子の実体は明らかとなっていない。一方、マグネシウム流入機構に関与する分子実体が明らかになってきた。

近年、TRPファミリーとしてTRPMの存在が報告され、なかでもTRPM6とTRPM7がマグネシウム流入チャネルとして機能していることが明らかになってきた。TRPM7の過剰発現や発現抑制が細胞死を引き起こすことや、TRPM7を介したカルシウム流入が細胞周期の調節に関与しているとの報告がある。しかし、TRPM6が細胞機能の維持に必要な否かは解明されていない。

マウスにおいて、17β-estradiolやマグネシウム摂取量の低下によってTRPM6 mRNAレベルが増加すると報告されている<sup>[3]</sup>が、TRPM6の詳細な発現調節機構は明らかになっていない。本研究で我々は、MEK阻害剤U0126によってTRPM6発現が減少し、TRPM7には影響しないことを明らかにした。最近、EGF前駆体遺伝子の変異体が、常染色体劣性低マグネシウム血症の患者で発見された<sup>[4]</sup>。さらに、抗ガン剤としてEGF受容体拮抗剤を使用した患者で、血中マグネシウム濃度の低下が報告されている。これらのことから、生体内および細胞内マグネシウム濃度の調節に、EGF/MEK/ERK経路が関係していることが推察された。

TRPM6の発現阻害剤を処理したものは、LDHがほとんど漏出しておらず、細胞傷害が起きていなかった。また、ネクローシスやアポトーシスといった細胞死が誘導されていないことも明らかになった。このことから、TRPM7と同様に、TRPM6も細胞周期の進行に関係することが示唆され

た。サイクリンD1の発現は、上皮細胞においてMEK/ERK経路によって調節され、G1期からS期への移行に関与している。サイクリンD1発現はEGFによって増加したが、U0126とTRPM6 siRNAによって減少したことから、NRK-52E細胞の細胞周期の調節には、サイクリンD1が重要な役割を果たしていると考えられる。U0126とTRPM6 siRNAの細胞周期に対する効果を検討したところ、G1期の細胞の増加とS期の減少が認められたことから、G1期からS期への移行が抑制されたと示唆される。以上のことから、U0126やTRPM6 siRNAは細胞内へのマグネシウム流入を減少させ、サイクリンD1発現を抑制することにより、G1期からS期への移行を抑制すると示唆された。

本研究で、NRK-52E細胞におけるTRPM6発現が、MEK/ERK経路によって調節されることを明らかにした。ERKのリン酸化により、c-Fosおよびc-Junが活性化され、TRPM6のプロモーター活性が亢進した。U0126やTRPM6 siRNAは細胞内へのマグネシウム流入を減少させ、サイクリンD1発現を抑制した。その結果、G1/S期の細胞周期の移行が抑制された。MEK/ERK経路の調節機構の異常は、TRPM6発現の低下により、細胞内マグネシウムホメオスタシスを破綻させると示唆される。

#### 5. 今後の課題

現代社会において、過度のストレスや食生活の変化によりマグネシウム摂取量と吸収量が減少している。マグネシウムは骨組織や筋肉などに貯蔵されており、血中濃度が減少してもすぐに補充されるため、慢性的なマグネシウム不足に気がつきにくい。マグネシウムを効率よく吸収および再吸収するために、マグネシウム輸送体をターゲットにした新しい食品因子や薬剤の開発が期待される。マグネシウム輸送体の発現や機能の調節機構に関する研究はまだ始まったばかりで、十分に解明されていない。今後、TRPM6を含めたマグネシウム輸送体の発現が、どのようなホルモンや食品因子で活性化されるのかを検討し、マグネシウム不足によって引き起こされる疾患の治療や改善に結びつけていきたい。

#### 文献等

[1] A. Ikari, M. Ito, C. Okude, H. Sawada, H. Harada, M.



- Degawa, H. Sakai, T. Takahashi, J. Sugatani, M. Miwa, Claudin-16 is directly phosphorylated by protein kinase A independently of a vasodilator-stimulated phosphoprotein-mediated pathway, *J Cell Physiol* 214 (2008) 221-229.
- [2] K.P. Schlingmann, S. Weber, M. Peters, L. Niemann Nejsum, H. Vitzthum, K. Klingel, M. Kratz, E. Haddad, E. Ristoff, D. Dinour, M. Syrrou, S. Nielsen, M. Sassen, S. Waldegger, H.W. Seyberth, M. Konrad, Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family, *Nat Genet* 31 (2002) 166-170.
- [3] W.M. Groenestege, J.G. Hoenderop, L. van den Heuvel, N. Knoers, R.J. Bindels, The epithelial  $Mg^{2+}$  channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary  $Mg^{2+}$  content and estrogens, *J Am Soc Nephrol* 17 (2006) 1035-1043.
- [4] W.M. Groenestege, S. Thebault, J. van der Wijst, D. van den Berg, R. Janssen, S. Tejpar, L.P. van den Heuvel, E. van Cutsem, J.G. Hoenderop, N.V. Knoers, R.J. Bindels, Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia, *J Clin Invest* 117 (2007) 2260-2267.

No. 0830

## Elucidation of Regulatory Mechanism and Physiological Role of Magnesium Channel in Renal Epithelial Cells

Akira Ikari

University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Sciences

### Summary

The magnesium balance of whole body is regulated by the kidney which adapts magnesium excretion based on net magnesium absorption from intestine. Chronic magnesium deficiency may be involved in the lifestyle-related diseases such as hypertension, diabetes, and hyperlipidemia and renal failure.  $Mg^{2+}$  filtrated by glomeruli is reabsorbed by transcellular and paracellular pathways in renal epithelial cells. Transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6) channel is expressed in the apical membrane and involved in the reabsorption of  $Mg^{2+}$ . The regulatory mechanism of TRPM6 expression has not yet been cleared.

TRPM6 mRNA and protein were endogenously expressed in rat renal tubular NRK-52E cells. Epidermal growth factor (EGF) increased the TRPM6 expression. The basal and EGF-induced TRPM6 expressions were inhibited by U0126, a MEK inhibitor, and LY294002, a PI3-K inhibitor, but not by SP600125, a JNK inhibitor, and SB202190, a p38 MAP kinase inhibitor. Promoter activity of human TRPM6 was observed in the TRPM6 5'-flanking region from -1,214 to -718. This promoter activity was enhanced by EGF and inhibited by U0126. The mutation of the putative AP-1 binding site (-741/-736) completely inhibited the basal and EGF-induced promoter activity. The introduction of c-Fos or c-Jun siRNA inhibited the basal and EGF-induced promoter activity. A chromatin immunoprecipitation assay revealed that c-Fos and c-Jun bind to the AP-1 binding site within the region of -1,214/-718. These results suggest that EGF up-regulates TRPM6 mRNA expression mediate via the activation of MEK/ERK/AP-1-dependent pathway.

EGF increased the proportion of cells in S phase and decreased that in G1 phase, whereas U0126 and TRPM6 siRNA increased the proportion in G1 phase and decreased that in S phase. Furthermore, cyclin D1 expression was decreased in the U0126-treated or TRPM6 siRNA-treated cells. These results suggest that TRPM6 is involved in the regulation of cell cycles.

EGF is secreted from epithelial cells after tubular injury. We suggest that EGF increases cell proliferation mediated via an increase in TRPM6 expression, resulting in the recovery from tubular injury.